

キュウリ緑斑モザイクウイルスに関する研究

第 3 報 メチルプロマイドによる土中のウイルスの不活化

井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二

I. 緒

言

キュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) はタバコモザイクウイルス (TMV) の場合と同じく土中の残根その他病植物の残骸によって土壌伝染をおこす可能性が高い。また、CGMMV が発生したビニールハウスの器材、礫耕栽培施設などもウイルスに汚染されていて、次の作付における伝染源になる可能性がある。これら伝染源になるおそれのある土壌、器材の実用的でしかも有効な消毒法は、現在までのところほとんどないといつてよからう。TMV の不活化のために各種の薬剤を用いた試験が幾つか報告されているが、有効な薬剤はあまり知られておらず、酸化エチレンやメチルプロマイドなどが有効な場合があるとされている (Wiggs ら, 1962, Johnson ら, 1963, 都丸ら, 1966), また、メチルプロマイドについては TMV の他に齊藤ら (1964) はコムギ萎縮ウイルス (WYMV) に対してメチルプロマイドが有効なことを報告した。しかし、Broadbent ら (1965) は、トマトの TMV に対し温室実験でメチルプロマイドは効果が認められなかったとしている。著者らはメチルプロマイドが CGMMV に対し、TMV や WYMV に対する場合と同じく効果があるのではないかと考え、一連の実験を行なった。その結果、夏期高温下の実験でメチルプロマイドが土中に埋没した CGMMV を TMV に対するよりは少ない薬量で不活化することを知った。実際の発病地での効果試験や、温度その他の薬剤処理の条件など、今後に解明されねばならない点が多く残されているが、実験の範囲で効果の認められた施用薬量は条件によっては実用的に使用可能な範囲と考えられるので、とりあえずこれまでに得られた実験成績を報告する。

II. 実験材料と方法

実験に用いたメチルプロマイドは久野島化学工業株式会社より供給されたものであり、所定量ずつアンプルまたは缶詰にしたものである。実験は 1966 年の夏と秋に行なった。密閉容器での試験で、夏の実験には $55\sim 640\text{g}/\text{m}^3$, 秋には (実験 4, 5) $15\sim 160\text{g}/\text{m}^3$ の薬量を、畑での試験には 60, 120 および $180\text{g}/3.3\text{m}^2$ の薬量を試験した。密閉容器を用いた実験の一つでは対照薬剤としてクロールピクリン (薬量は $500\text{g}/\text{m}^3$) を加えた。

CGMMV で発病させたキュウリの生葉、乾燥葉、茎、根などをウイルス材料とし、各 1 g ずつをガーゼに包み、土中に埋めた。実験の一つでは TMV を対照ウイルスとし、病植物 (タバコ) 生葉および乾燥葉を同様にして土中に埋めた。

本報告の概要は昭和 41 年度日本植物病理学会関西西部会で講演した。

戸外の日蔭に置いた20ℓ入りのポリエチレン製容器に畑土をつめ、ウイルス材料は土の表面から20cmの深さに埋め、土の表面にメチルプロマイドのアンブルを置き、ビニール布で容器を密閉した上でアンブルを破壊して内容を蒸発させた。クロールピクリンは注射器で土に注入した、畑での実験では5m²をビニール布で覆い、ビニール布の中央部は高さ約15~20cmの空間が土の表面にできるようにし、周囲は土をかけて押えるようにした。ウイルス材料は地表、20cm、および30cmの深さに埋め、メチルプロマイドは所定薬量を缶詰からゴム管で導いて、ビニール布と地表の間の空間に噴出させた。薬剤噴出場所はウイルス材料埋没地点から30cmまたは60cm離すようにした。

密閉容器の場合には24時間および48時間後、畑の場合には48時間後にビニール布被覆をとりはずし、ウイルス材料を掘り上げた。ウイルス材料はpH 7.0のM/100リン酸buffer 10mlですりつぶし、CGMMV材料の搾汁はキュウリ幼苗、チョウセンアサガオおよびペチュニアに、TMVは*N. glutinosa*に汁液接種してウイルスの病原性を調べた。また、一部の実験ではこれら搾汁につき電子顕微鏡下でウイルス粒子の形態を観察し、さらに、微凝集反応によって抗CGMMV血清との反応の有無を調べた。

III. 実 験 結 果

1. 密閉容器中でのメチルプロマイド処理の効果

実験1 (薬剤処理期間: 7月25~26日, 処理期間中の気温: 最高33.7°C, 最低23.7°C 平均29.1, 27.9°C) TMVを対照ウイルス, クロールピクリンを対照薬剤に加えて実験した結果を第1表に示した。TMVの場合にはJohnsonら(1963)の報告した成績とほぼ一致し、クロールピクリンはTMV不活化作用を示さなかったが、メチルプロマイドはTMVを不活化した。メチルプロマイドの薬量とTMVによる*N. glutinosa*のlocal lesion数との関係もJohnsonらの成績に似ており、TMVの完全な不活化には48時間処理で640g/m³ (4 lb/100 ft³)の薬量を要した(第1図B), 一方、CGMMVに対しては、クロールピ

第1表 土に埋めたCGMMVおよびTMVに対するメチルプロマイドの不活化効果(20ℓ入り密閉容器での実験1)

処 理 時 間 hr		24				48				クロール ピクリン
メチル プロマイド	薬量g/m ³	0	160	320	640	0	160	320	640	
CGMMV	生 葉	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	乾 燥 葉	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	茎	10	1	0	0	10	0	0	0	10
TMV	生 葉	>800	99	61	1	>800	13	6	0	>750
	乾 燥 葉	>750	147	101	0	>800	44	25	0	>600

CGMMV は接種したキュウリ幼苗10本中の発病本数

TMV は *N. glutinosa* の接種葉3枚に生じた病斑数の合計

処理期間: 7月25~26日

処理期間中の気温: 最高33.7°C, 最低23.7°C, 平均29.1, 27.9°C

クロールピクリンの薬量は500g/m³



第 1 図 土中に埋没した CGMMV (A) および TMV (B) に対する
メチルブロマイドのウイルス不活化効果の判定

(A) 第 2 表参照 左, メチルブロマイド $55\text{g}/\text{m}^3$ 48 時間処理; 右半葉は無処理区
右, " $480\text{g}/\text{m}^3$ " "

(B) 第 1 表 48 時間処理区参照

左よりメチルブロマイド処理薬量 0, 160, 320, および $640\text{g}/\text{m}^3$

クリンが不活化作用をまったく示さなかったのに比べ, メチルブロマイドの効果は極めて顕著であった。茎(生組織)をウイルス材料とした場合, 薬量 $160\text{g}/\text{m}^3$ ($1\text{ lb}/100\text{ ft}^3$), 24 時間処理したものでウイルス不活化が不完全であった他は, 生葉, 乾燥葉, 茎のいずれについてもすべて完全な不活化作用が認められた。

実験 2 (薬剤処理期間: 8 月 8 ~ 9 日, 処理期間中の気温: 最高 34.5°C , {最低 24.6°C 平均 $28.7, 29.4^\circ\text{C}$) ウイルス材料に病植物生葉と根を用い, メチルブロマイドは薬量を実験 1 の場合より減らし, $55, 110$ および $160\text{g}/\text{m}^3$ で実験した。薬剤処理の効果はキュウリ 幼苗の他に チョウセンアサガオ も用いて調べた。チョウセンアサガオ の接種葉の

半葉には無処理病葉搾汁を処理区の場合の2倍に希釈して接種した。第2表に実験結果を示した。キュウリ幼苗を用いた検定結果では、55g/m³ 24時間処理のもので効果が不完全であった他は、薬量、処理時間の如何をとわず CGMMV は完全に不活化された。チョウセンアサガオの local lesion を用いた検定では、対照の無処理病葉搾汁を接種した半葉に極めて多数の local lesion を生じたのに比べ、メチルブロマイド処理したものでは 55g/m³ 2日処理区に少数の疑わしい lesion を生じた他はまったく病斑の形成が認められなかった(第1図A)。

第2表 土に埋めた CGMMV に対するメチルブロマイドの不活化効果 (20/入り密閉容器での実験2)

メチル ブロマイド	処理時間hr	24			48					
	薬量 g/m³	55	110	160	55	110	160	480	0	
ウイルス 材料	検 定 植 物									
葉	キ ュ ウ リ	1	0	0	0	0	0	0	0	10
	チョウセンアサガオ				3	0	0	0	0	
					>900	>4,100	>3,100	>1,150		
根	キ ュ ウ リ	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	チョウセンアサガオ				0	0	0	0	0	
					>1,000	>900	>1,200	>3,200		

接種したキュウリ幼苗10本中の発病本数

チョウセンアサガオは半葉に処理区(分子)、無処理区(分母)を接種し、生じた local lesion 数(各3葉の合計)であらわした。

処理期間: 8月8~9日, 処理期間中の気温: 最高34.5°C, 最低24.6°C, 平均28.7, 29.4°C

実験3 (薬剤処理期間: 8月23~24日, 処理期間中の気温: 最高30.2°C, 最低24.9°C, 平均28.0, 27.0°C) 前の実験結果確認のために, 実験2と同じ薬量を用いて試験した。第3表に結果を示したように, 実験2の場合と同じく, 55g/m³ 1日処理区で効果が不十分であった他は, どの処理区でもウイルス不活化は完全と認められた。

第3表 土に埋めた CGMMV に対するメチルブロマイドの不活化効果 (20/入り密閉容器での実験3)

メチルブロマイド	処理時間hr	24				48				0
	薬量 g/m³	55	110	160	480	55	110	160	480	
ウイルス材料	検 定 植 物									
葉	キ ュ ウ リ	2	0	0	0	0	0	0	0	10

接種したキュウリ幼苗10本中の発病本数

処理期間: 8月23~24日

処理期間中の気温: 最高30.2°C, 最低24.9°C, 平均28.0, 27.0°C

実験4 (薬剤処理期間: 9月22~23日, 処理期間中の気温: 最高23.5°C, 最低17.0°C, 平均20.8, 18.3°C) 秋の低温期に少ない薬量での効果がどのように変わるかを試験した。第4表に示すように, ペチュニアの local lesion で検定したところでは 55g/m³ でか

なり効果があらわれ、 160g/m^3 で完全に不活化が起きたように見うけられたが、キュウリを検定植物に用いた場合には、実験1～3の夏の場合と異なり 55g/m^3 の薬量で CGMMV 不活化効果は不十分であり 160g/m^3 でも効果は完全とは云えなかった。この薬量の24時間処理で完全な効果が認められたにもかかわらず48時間処理で不完全であったことは、この実験の条件下では 160g/m^3 の薬量が CGMMV 完全不活化のための限界薬量であることを示しているのかもしれない。

実験5（薬剤処理期間：10月18～19日、処理期間中の気温：最高 21.8°C 、最低 8.7°C 、平均 14.1 および 16.0°C ）秋の低温期には少ない薬量ではメチルプロマイドの効果が期待できないので、さらに薬量を増して実験した。この実験では TMV を比較ウイルスとして用いた。実験結果を第5表に示す。TMV は夏高温時（実験1）の場合と異なり 640g/m^3 の薬量でも完全不活化に至らなかった。一方、CGMMV はこの実験の場合 160g/m^3 の薬量では不十分であったが、それ以上では完全に不活化された。

2. 畑でのメチルプロマイド処理の効果

メチルプロマイドは密閉した容器中で CGMMV を効果的に不活化することが判明したので、畑でも同様の効果を期待できるかどうか調べた。実験はほぼ同じような設計で2回反復して行ない、処理時間は48時間とした。実験1は8月10～11日に薬剤処理し、実験2では、8月18～19日に処理した。ビニール被覆下の気温、地温は測定しなかったが、処理期間中の気温は実験1で最高 35.2°C 、最低 25.0°C 、平均 29.7 、 29.4°C 、実験2では最高 31.3°C 、最低 24.9°C 、平均 28.9 、 28.0°C であった。第6表、第7表に実験成績を示した。表から明らかなように、メチルプロマイド噴出口か

第4表 土に埋めた CGMMV に対する
メチルプロマイドの不活化効果
(20ℓ入り密閉容器での実験4)

処理時間 hr	メチルプロマイド薬量 g/m^3				
	0	15	30	55	160
24	—	10	10	10	0
48	10	10	10	10	4
	*1065	469	430	47	0

キュウリ幼苗10本中の発病本数

* 48時間処理のものにつきベチュニアの接種葉各5枚に生じた local lesion 数の合計

処理期間：9月22～23日

処理期間中の気温：最高 23.5°C 、最低 17.0°C 、平均 20.8 および 18.3°C

第5表 土に埋めた CGMMV および TMV に対するメチルプロマイドの不活化効果
(20ℓ入り密閉容器での実験5)

処理時間 hr	48				
	0	160	320	480	640
メチルプロマイド薬量 g/m^3					
CGMMV	15*	1	0	0	0
TMV	1,501**	570	325	28	41

* キュウリ幼苗15本に接種して発病した本数

** *N. glutinosa* の接種葉4枚に生じた病斑数の合計

処理期間：10月18～19日

処理期間中の気温：最高 21.8°C 、最低 8.7°C 、平均 14.1 、 16.0°C

第6表 畑に埋めた CGMMV に対するメチルプロマイドの不活化効果（実験1）

ウイルス材料埋設の深さ cm	メチルプロマイド薬量 g/3.3m^2			
	0	60	120	180
1	12	0	0	0
20	—	0	0	0
30	—	0	0	0

キュウリ幼苗12本に接種して発病した本数

処理期間：8月10～11日

処理期間中の気温：最高 35.2°C 、最低 25.0°C 、平均 29.7 、 29.4°C

らの距離(最大 60cm), ウイルス材料を埋めた深さ(最深 30cm)にかかわらず, 60g/3.3m²* の薬量でも CGMMV は完全に不活化された。

3. メチルプロマイド処理した CGMMV の粒子の形態および抗原性

密閉容器を用いてメチルプロマイド処理を行なった前述の実験3の2日間処理区のウイルス材料につき, CGMMV 粒子の形態と抗原性との変化があるかどうかを調べた。粒子の長さの測定結果を第2図に, 微凝集反応を用いた血清反応試験結果を第8表に示した。

275~325m μ の長さの粒子は無処理 CGMMV で全測定粒子数の 67.2%であったのに比べ, メチルプロマイド処理ウイルスでは薬量が 55, 110, 160 および 480g/m³ の場合に

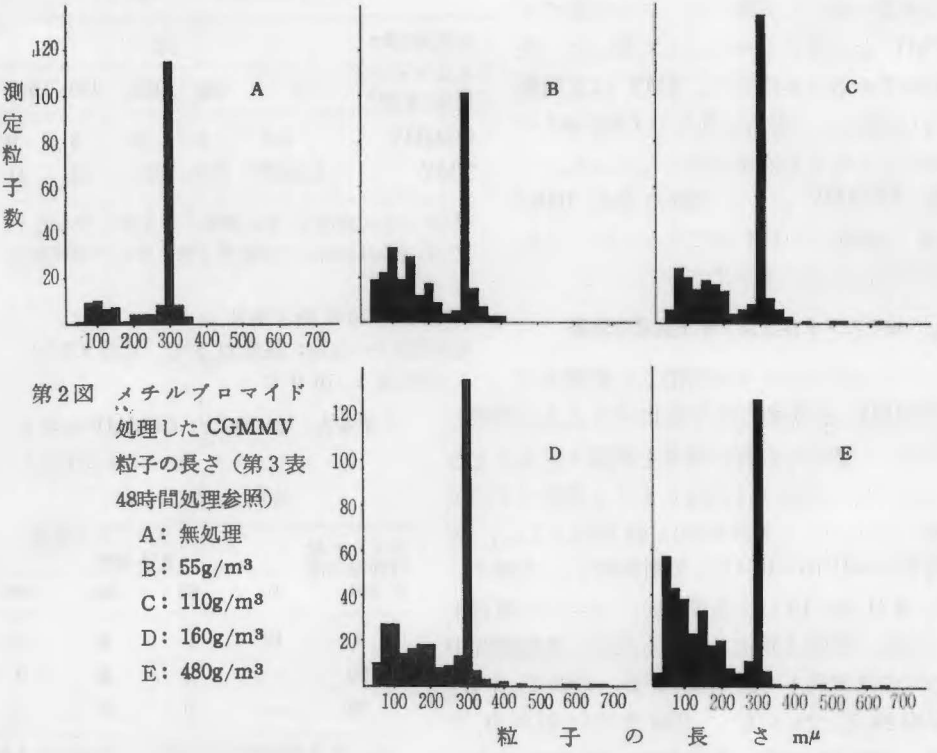
第7表 畑に埋めた CGMMV に対するメチルプロマイドの不活化効果(実験2)

ウイルス材料を埋めた場所の		メチルプロマイド薬量 g/3.3m ²			
薬剤噴出口 からの距離cm	深さ cm	0	60	120	180
30	20		0	0	0
	30		0	0	0
60	1	10	0	0	0
	20	10	0	0	0
	30	10	0	0	0

キュウリ幼苗 10 本に接種して発病した本数

処理期間: 8月18~19日

処理期間中の気温: 最高 31.3°C, 最低 24.9°C, 平均 28.9, 28.0°C



第2図 メチルプロマイド処理した CGMMV 粒子の長さ(第3表 48時間処理参照)
A: 無処理
B: 55g/m³
C: 110g/m³
D: 160g/m³
E: 480g/m³

* 昭和41年秋の日本植物病理学会での講演要旨では 30g/3.3m² としたがこれは 60g/3.3m² の誤りであったので訂正する。

それぞれ 37.2, 57.2, 49.7 およ
び 35.8% と減少し、とくにはっ
きりした傾向とはいえないが、薬
量の多い処理区で短粒子の割合が
高いようにも見うけられた。

血清反応試験では第 8 表から明
らかなように、薬量の如何によ
らず、メチルプロマイドで不活
化されたウイルス材料も無処理
CGMMV と同様に強い抗原性を
示した。実験には健全植物を用い
ていないが、抗 CGMMV 血清は
健全植物搾汁とは反応しないもの
である。

第 8 表 メチルプロマイドにより不活化
された CGMMV の抗原性

血 清 希 釈 1:	メチルプロマイド薬量 g/m ³				
	0	55	110	160	480
抗 CGMMV 血清	50	冊	冊	冊	冊
	200	冊	冊	冊	冊
生 理 食 塩 水	—	—	—	—	—
正 常 血 清	50	—	—	—	—
	200	—	—	—	—
生 理 食 塩 水	—	—	—	—	—

第 3 表の 48 時間処理材料を用いた試験

抗原にはメチルプロマイド処理したキュウリ病葉の 40 倍
遠心搾汁を用いた微凝集反応試験の結果

IV. 考 察

メチルプロマイドの土中に埋没した TMV に対する不活化作用については Broadbent
ら (1965) はトマトの TMV につき冬のガラス室条件下の実験で陰性の結果を報告して
いるが、明瞭な陽性の結果についての報告もある、Wiggs ら (1962) によると 3 lb/100 ft³,
Johnson ら (1963) は 3~4 lb/100 ft² の薬量を 48 時間処理することにより、TMV が完全
に不活化されたという。本報の実験でも、夏期の高温条件下の実験で土中 20 cm の深さ
に埋めた TMV (タバコ病生葉および乾燥葉) は、クロールピクリン処理でまったく不活化
されなかったのに比べ、メチルプロマイドの 320g/m³ (2 lb/100 ft³) の薬量 48 時間処理
は効果が不完全であったが、640g/m³ (4 lb/100 ft³) では完全な不活化が認められ、Wiggs
らおよび Johnson らの結果とはほぼ一致した。しかし、Wiggs らも気温が低いと効果も低
下するとの結果を得ているが、本報の実験でも同様の傾向が推測され、秋の比較的低温条件
下では 640g/m³ の薬量では不十分であった。著者らの一連の実験からみて、CGMMV は
TMV よりはるかに少ない薬量のメチルプロマイドによって不活化され、夏期高温条件下
では 110g/m³ 以上 (密閉容器中) および 60g/3.3m² 以上 (畑) の薬量ではほとんど例
外なく完全に不活化されるものと認められた。しかし、秋の低温条件下 (密閉容器中) で
は CGMMV 完全不活化にはさらに多くの薬量を要し、本報の実験の範囲では少なくとも
160g/m³ がその限界薬量と考えられた。キュウリのビニールハウス栽培にメチルプロマイ
ドが使用されている場面はまだそれほど多くないと思われるが、現在、主としてビニ
ールハウス内で栽培されているキュウリの疫病を対象に用いられる薬量は約 100g/3.3m²,
露地条件では約 60g/3.3m² といわれる。本報の結果で明らかなように、メチルプロマイ
ドは CGMMV に対し夏期の高温条件下では 60g/3.3m² の薬量でも有効なので、CGMMV
防除に使用できる見込みが大きい。ただし、本報の実験はウイルス材料を耕起した土中に
埋めて試験したものであり、キュウリ栽培跡の土中深く病植物根が残留した場合と比べて
土壌条件が大きく異なる。さらに、CGMMV の土壌伝染の実態にしても明らかでない点

も多いので、ここに報告した実験成績だけからメチルブロマイドを実際的に使用可能と速断することはできない。したがって、さらに今後、病植物残根による CGMMV の土壤伝染が土中のどの程度の深さの場所で起るもののかなど、土壤伝染の実態、メチルブロマイドの浸透性と土壤条件などの関係、温度と使用薬量の関係、その他の諸問題につき、詳細な実験が行なわれた上でメチルブロマイドの利用価値が決定されなければならない。しかし、ウイルス汚染部位の比較的把握しやすいビニールハウスの諸器材、礫耕施設などについては、本報に示された薬量のメチルブロマイドにより、消毒効果を上げることはおそらく可能ではなかろうか。

齊藤ら (1964) は精製した WYMV に各種薬剤を処理して不活化ウイルスの形態的变化を観察し、不活化ウイルスでも形態的变化のあるものとないものがあると述べた。WYMV はメチルブロマイド処理により粒子が崩壊するとのことである。本報の実験の範囲のメチルブロマイド薬量では不活化 CGMMV 粒子の著しい崩壊は認められず、また、不活化ウイルスは抗原性を失っていなかった。メチルブロマイドによるウイルス不活化がどのような機構で行なわれるか、また、TMV に比べて CGMMV が少ない薬量で不活化されることなど、種々の興味ある問題が含まれていると考えられる。

V. 摘 要

土中に埋没した CGMMV に対するメチルブロマイドの不活化作用を調べた。

20ℓ入りの密閉容器に畑土をつめ、20cm の深さに CGMMV 病キュウリの生葉、乾燥葉、茎、根などを埋め、種々の薬量のメチルブロマイドを24、48時間作用させてウイルス不活化の有無を調べた。15~640g/m³ の範囲の薬量を用いて処理した後、キュウリ幼苗およびチョウセンアサガオに接種して処理効果を検定した。夏の高温条件下（平均気温 27.0~29.4°C）では 55g/m³ 1日処理の場合が不完全であった他は、これ以上の薬量ですべて完全な CGMMV 不活化が認められた。一方、秋の比較的低温条件（平均気温 14.1~20.8°C）での実験によると、CGMMV の完全な不活化には少なくとも 320g/m³ 以上の薬量を要した。比較に用いたクロールピクリンにはまったく効果が認められなかった。TMV は夏の実験で 640g/m³ のメチルブロマイド処理の場合にはじめて完全に不活化されたが、秋の実験ではこの薬量での不活化は不十分であった。

夏の高温時に 5m² の畑で 0~30cm の深さに CGMMV 材料を埋め、地表をビニール布で覆ってメチルブロマイドを処理し、ウイルス不活化の有無を調べた。この場合、ウイルス材料を埋めた場所の如何によらず、60g/3.3m² 以上の薬量で CGMMV は完全に不活化された。

メチルブロマイドにより不活化された CGMMV は粒子の形態に著しい変化は認められず、抗原性も維持されていた。

文 献

1. Broadbent, L., Read, W. H. and Last, F. T. 1965. The epidemiology of tomato mosaic. X. Persistence of TMV-infected debris in soil, and the effects of soil partial sterilization. Ann. appl. Biol. 55: 471-483.

2. 井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二. 1967. キュウリ 緑斑 モザイクウイルスに関する研究. 第1報. 病原ウイルスの同定. 農学研究 51: 175—186.
3. 井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二. 1967. キュウリ 緑斑 モザイクウイルスに関する研究. 第2報. 伝搬に関する2, 3の実験. 農学研究 51: 187—197.
4. Johnson, E. M. and Chapman, R. A. 1963. Chemical inactivation of tobacco mosaic virus in tomato roots. Pl. Dis. Repr. 47: 389—391.
5. 齊藤康夫・高梨和雄・岩田吉人・岡本 弘. 1964. 土壌伝染性 ムギウイルス 病に関する研究. III. 薬剤処理が病土およびウイルスに及ぼす影響. 農技研報告C 17: 41—59.
6. 都丸敏一・西田耕. 1966. エチレンオキシドによるタバコモザイクウイルスの不活化. 日植病報. 32: 94.
7. Wiggs, D. N. and Lucas, G. B. 1962. Inactivation of tobacco mosaic virus by volatile chemicals. Phytopath. 52: 983—985.